

*“Nem a kép tárgya a fontos,
hanem a szellemi valóság, amely általa testet öltött.”*
Bernáth Aurél

Exogén és endogén faktorok indukálta komplex kölcsönhatások a melanoma mikrokörnyezetében

PhD értekezés tézisei

Gyukity-Sebestyén Edina

Témavezető:

Dr. Buzás Krisztina, PhD

Immunológiai Tanszék, Szegedi Tudományegyetem,
Szegedi Biológiai Kutatóközpont



Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola,
Általános Orvostudományi Kar, Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2020

Az értekezés alapját képező közlemények:

- I. **Gyukity-Sebestyén E**, Harmati M, Dobra G, Németh IB, Mihály J, Zvara Á, Hunyadi-Gulyás É, Katona R, Nagy I, Horváth P, Bálint Á, Szkalitsity Á, Kovács M, Pankotai T, Borsos B, Erdélyi M, Szegletes Z, Veréb ZJ, Buzás EI, Kemény L, Bíró T, Buzás K. Melanoma-Derived Exosomes Induce PD-1 Overexpression and Tumor Progression via Mesenchymal Stem Cell Oncogenic Reprogramming. *Front Immunol.* **10**, 2459. doi: [10.3389/fimmu.2019.02459](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02459) (2019) **IF 5,085; Q1**
- II. Buzás K, Marton A, Vizler C, **Gyukity-Sebestyén E**, Harmati M, Nagy K, Zvara Á, Katona RL, Tubak V, Endrész V, Németh IB, Oláh J, Vigh L, Bíró T, Kemény L. Bacterial Sepsis Increases Survival in Metastatic Melanoma: Chlamydomonas Pneumoniae Induces Macrophage Polarization and Tumor Regression. *J Invest Dermatol.* **136**, 862-5. doi: [10.1016/j.jid.2015.12.032](https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.12.032) (2016) **IF 6,287; Q1**

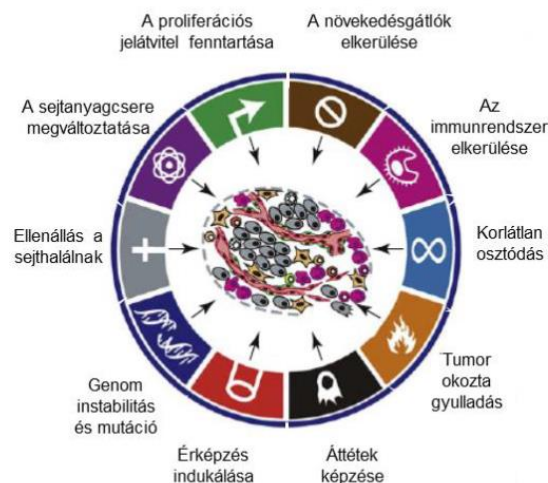
További publikációk:

- I. Dobra G, Bukva M, Szabo Z, Bruszel B, Harmati M, **Gyukity-Sebestyén E**, Jenei A, Szucs M, Horvath P, Biro T, Klekner A, Buzas K. Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of CNS Tumors. *Int J Mol Sci.* **21**(15). doi: [10.3390/ijms21155359](https://doi.org/10.3390/ijms21155359) (2020) **IF 4,556; Q2**
- II. Harmati M, **Gyukity-Sebestyén E**, Dobra G, Janovak L, Dekany I, Saydam O, Hunyadi-Gulyas E, Nagy I, Farkas A, Pankotai T, Ujfaludi Z, Horvath P, Piccinini F, Kovacs M, Biro T, Buzas K. Small extracellular vesicles convey the stress-induced adaptive responses of melanoma cells. *Sci Rep.* **9**;15329. doi: [10.1038/s41598-019-51778-6](https://doi.org/10.1038/s41598-019-51778-6) (2019) **IF 3,998; Q1**
- III. Zsedenyi A, Farkas B, Abdelrasoul GN, Romano I, **Gyukity-Sebestyén E**, Nagy K, Harmati M, Dobra G, Kormondi S, Decsi G, Nemeth IB, Diaspro A, Brandi F, Beke S, Buzas K. Gold nanoparticle-filled biodegradable photopolymer scaffolds induced muscle remodeling: *in vitro* and *in vivo* findings. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **72**,625-630. doi: [10.1016/j.msec.2016.11.124](https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.124) (2016) **IF 5,08; Q1**
- IV. Harmati M, Tarnai Z, Decsi G, Kormondi S, Szegletes Z, Janovak L, Dekany I, Saydam O, **Gyukity-Sebestyén E**, Dobra G, Nagy I, Nagy K, Buzas K. Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells. *J Oral Pathol Med.* **46**,259-266. doi: [10.1111/jop.12486](https://doi.org/10.1111/jop.12486) (2017) **IF 2,237; Q2**
- V. Harmati M, **Gyukity-Sebestyén E**, Dobra G, Terhes G, Urban E, Decsi G, Mimica-Dukić N, Lesjak M, Simin N, Pap B, Nemeth IB, Buzas K. Binary mixture of Satureja hortensis and Origanum vulgare subsp. hirtum essential oils: in vivo therapeutic efficiency against Helicobacter pylori infection. *Helicobacter.* **22**,e12350. doi: [10.1111/hel.12350](https://doi.org/10.1111/hel.12350) (2017) **IF 4,123; Q1**
- VI. Dobó J, Harmat V, Beinrohr L, **Sebestyén E**, Závodszy P, Gál P. MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol.* **183**,1207-14. doi: [10.4049/jimmunol.0901141](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901141) (2009) **IF 5,0; Q1**
- VII. Dobó J, Harmat V, **Sebestyén E**, Beinrohr L, Závodszy P, Gál P. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human mannose-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) catalytic region. *Acta Cryst.* **64**,781-784. doi: [10.1107/S174430910802294X](https://doi.org/10.1107/S174430910802294X) (2008) **IF 0,91; Q3**

1. Bevezetés

A malignus daganatokra általánosan jellemző 10 legfontosabb biológiai sajátosságot Hanahan és Weinberg foglalta össze (Fig. 1), irányítva a tumoros megbetegedések megértéséhez.

A tumorszövet nem csupán a tumoros sejtek heterogén populációjából áll, körbeveszik a tumort infiltráló különböző gazdasejtek, szekretált faktorok, extracelluláris mátrix fehérjék, melyeket összefoglaló néven tumoros mikrokörnyezetnek (TME) nevezünk. A TME egy folyamatosan változó, dinamikusan fejlődő környezet. A tumorsejtek az általuk kiválasztott különböző kemokinek, citokinek, növekedési faktorok és extracelluláris



1. ábra. A rák fémjelei.

vezikulák (EV) révén képesek manipulálni a mikrokörnyezetüket. A tumort támogató mikrokörnyezet kialakulása elengedhetetlen feltétele a tumor ellenőrzés nélküli növekedésének.

A mezenhimális őssejtek (MSC) a TME egyik fő alkotó elemei. Az MSC-k a tumorsejtek által kiválasztott kemokinek, citokinek és EV-k hatására vándorolnak a TME-be. Kimutatták, hogy tumorális hatásra az MSC-k tumor-asszociált sejtekké képesek differenciálódni. Az MSC-k tumor támogató, illetve tumor ellenes szerepéről az irodalmi adatok ellentmondásosak. Az MSC-k szerepe függ a tumor típusától és a sejtek állapotától.

A TME kialakulása során elsődlegesen a monociták verbuválása történik meg. A tumor-asszociált makrofágok (TAM) fenotípusát a tumor fejlődése során a mikrokörnyezetében termelődő faktorok határozzák meg. A TAM-ok kulcsszerepet játszanak olyan onkogén folyamatokban, mint a tumor proliferációja, az angiogenezis és a metasztázis képződés.

Mint a Th1/Th2 limfociták, a makrofágok is feloszthatók két polarizált részhalmozatra; a klasszikusan aktivált M1 típusú, illetve alternatív módon aktivált M2 típusú makrofágokra. Az M1 típusú makrofágok által termelt molekulák antimikrobiális és tumorelles hatással bírnak. A TME-ben az M1 típusú makrofág túlsúly bizonyos esetekben jó előrejelzésnek számít. Az alternatív mechanizmussal aktiválódott M2 típusú makrofágok antigénprezentáló képessége gyenge, inkább a sejttermelést eltávolító, a károsodott szöveteket újraépítő, a daganatok fennmaradását segítő, és érképződést támogató funkciójuk áll előtérben, továbbá

immunszuppresszív faktorok kibocsátásával gátolják az adaptív immunválaszt. A TAM-ok számának csökkentése, vagy polarizációjuk M1 fenotípus irányba történő eltolása tumorterápiás cél lehet. Már több mint 100 évvel ezelőtt felismerték, hogy a bakteriális fertőzést követően egyes daganatos betegek meggyógyulnak (Coley toxin). Jóllehet, általánosan elfogadott tény, hogy az antibakteriális immunválasz átfed a tumorelles immunválasszal, ám ennek a pontos mechanizmusa még nem ismert.

Az áttétképzés a rosszindulatú daganatok legfőbb jellemzője, és a legtöbb, tumorról kapcsolatos haláleset oka. Stephen Paget "mag és talaj" áttétképzési elmélete szerint az áttétek szóródása nem véletlenszerű. A tumorok képesek előidézni egy távoli szervben olyan mikrokörnyezet kialakulását, amely a később beérkező tumorsejtek túlélését és növekedését támogatják. Ezt az előre biztosított, támogató mikrokörnyezetet pre-metasztatikus niche-nek (PMN) nevezzük.

Az EV-k a sejtek által, az extracelluláris térbe kibocsátott lipidvezikulák. Három fő típusát különböztetjük meg: mikropartikulákat, mikrovezikulákat (100–1.000 nm), és az exoszómákat (20–200 nm). A legkisebb EV-k az endoszómális úton keletkező exoszómák (<200 nm). Az exoszómák a multivezikuláris testek (MVB) membránjáról befelé, a lumen irányába történő lefűződéssel jönnek létre. A folyamat során számos fehérje, nukleinsav, transzkripció faktor és lipid képes válogatottan becsomagolódni a sejt típusától függően. Az exoszómák molekuláris összetételük révén a sejtek közötti kommunikáció egyedi egységeiként értelmezhetők, melyek mintázata nem független a kibocsátó sejt típusától és állapotától. Eszerint a daganatos sejtekből származó exoszómák olyan molekuláris információt szállítanak, melyek szerepet játszanak a tumoros mikrokörnyezet kialakulásában.

Mint fentebb már említettem, a metasztázist megelőzően a daganat képes a távoli célszervekben a tumorsejt megtelepedését és növekedését támogató mikrokörnyezet kialakítására, melyet pre-metasztatikus niche-nek (PMN) nevezünk. Az elmúlt években számos közlemény jelent meg az exoszómák PMN kialakulásában betöltött közvetítő szerepéről.

A melanoma malignum a melanocitákból kiinduló invazív, kifejezetten áttétképző sajátsággal rendelkező daganat. Mára a melanoma incidenciájának növekedése a letális daganatok között a második. Gyakorisága és halálozási rátája világviszonylatban nagyon változó, az adott ország alapellátásától és a korai felismeréstől függően. A WHO adatai szerint 2018-ban, az EU-ban 100.000 emberből 12,6 esetben diagnosztizáltak malignus melanomát. Más tumoros megbetegedésekhez hasonlóan, a melanoma fejlődése és progressziója is egy szekvenciális genetikai modellt követ, mely onkogének aktivációjának és tumorszupresszor gének inaktivációjának sorozatából áll. Számos genetikai változás túlműködést okoz az érintett

celluláris útvonalakban, főként a mitogén-aktivált-protein-kináz (MAPK), a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K), a protein-kináz-B (AKT), a foszfatáz-és-tenzin homológ (PTEN), valamint az emlős rapamycin-célpont (mTOR) jelátviteli útvonalakban.

A PD-1 expressziója nem egyértelműen jellemző a melanoma sejtekre. Komoly jelentőséggel bír egy a közelmúltban megjelent közlemény, melyben leírták, hogy a PD-1 receptort kifejező melanoma sejtpopuláció különösen agresszív. A melanoma sejteken PD-1:PD-L1 kölcsönhatás modulálja az mTOR jelátviteli útvonalat, így zavarva a programozott sejthalált. A tanulmány a PD-1 túltermelés következményeire fókuszál, a PD-1 funkcióját kísérletesen gátolva (Pdc1-shRNS-sel illetve anti-PD-1 antitesttel), azonban nem határozza meg azokat a tényezőket, amelyek aktiválása a PD-1 molekulát túltermelő alpopulációk kialakulásához vezet. Ez a kérdés azonban különösen érdekes annak fényében, hogy a ma elérhető egyik leghatékonyabb immunterápia a fent említett PD-1: PD-L1 kölcsönhatás blokkolásán alapul. A melanoma kialakulásában a melanociták genetikai változásai mellett a mikrokörnyezet elemei közötti kölcsönhatások is kulcsfontosságúak.

2. Célkitűzések

Jelen tanulmányban célunk volt meghatározni, hogy a TME egyes összetevői milyen módon támogatják a melanoma pro-metasztatikus karakterének kialakulását. A pro-metasztatikus jellemzők gyakran az adott szöveti mikrokörnyezettől függenek. A TME-t egyrészt a daganat szempontjából, másrészt a tumor sztrómájába beszűrődő immunsejtek viselkedésének szempontjából vizsgáltuk.

Célul tűztük ki, hogy felderítsük, hogyan befolyásolják a daganat progresszióját a tumorsejtek által kibocsátott exoszómák, illetve a daganatba beszűrődő makrofágok különféle típusai (M1, M2).

Feltételeztük, hogy a melanoma eredetű exoszómák elősegítik a tumor progresszióját, míg a tumorról asszociált makrofágok M1 irányú polarizációja a daganat regresszióját támogatja.

Ebben a munkában céljaink a következők voltak:

1. Leírni az MSC sejteken malignus változásokat indukáló celluláris és molekuláris folyamatokat, melyeket intercelluláris kommunikáció útján melanoma eredetű exoszómák közvetítenek.
2. Megvizsgálni a PD-1 receptor – mint melanoma marker és terápiás célpont – kifejeződésének melanoma eredetű exoszómák hatására bekövetkező változásait.

3. Leírni a melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák tumor progresszióban *in vivo* betöltött szerepét.
4. Megismerni a makrofág polarizáció tumor regresszióra gyakorolt hatását.

3. Anyagok és módszerek

Egerek

A C57BL/6N és az immunodeficiens NOD/Scid IL2rg null (NSG) egerek a Charles River Laboratories-tól (Sulzfeld, Németország) származtak. Az állatokat patogénmentes környezetben tartottuk, a kísérleteket a nemzeti (1998. XXVIII; 40/2013) és az európai (2010/63/EU) állatetikai irányelveknek megfelelően végeztük. A kísérleti protokollokat a MTA-SZBK Állatkísérleti és Etikai Bizottsága, valamint a Magyar Országos Állatkísérleti és Etikai Bizottság jóváhagyta (az engedélyek száma: XVI./03521/2011, CSI/01/3929-4/2017, XVI./03521/2011 valamint CSI/01/3929-4/2017).

Sejtvonalak és sejtkultúrák

A B16F1 melanoma sejtvonalat (ECACC) DMEM tápfolyadékban, 10% FBS (Euroclone), 0,01% nátrium-piruvát, 1% MEM nem-esszenciális aminosavak, 1% MEM vitamin, 2 mM L-glutamin és 1% P/S/A oldatokkal (mind Lonza) kiegészítve tartottuk kultúrában.

Az egér MSC sejteket C57BL/6N egerekből izoláltuk. A hasi, bőr alatti zsírszövetet az eltávolítást követően RPMI 1640 tápoldattal mostuk, és apróra daraboltuk. Az ilyen módon homogenizált szövetet 100 µg/ml kollagenáz (Sigma-Aldrich) tartalmú RPMI 1640 tápoldatban szuszpendáltuk fel, majd 37 °C-on 50 percig inkubáltuk. A kollagenázt 10% FBS-tartalmú tápoldattal közömbösítettük, majd 470 × g-vel 15 percig centrifugáltuk, és tápfolyadékkal mostuk a sejteket. Ezt követően a sejteket MesenCult tápoldatban (Stemcell Technologies) szuszpendáltuk fel, és 100 µm pórusméretű sejtszűrőn (BD Biosciences) engedték át a sejttenyésztő edénybe, majd 37 °C-on, 5% CO₂ és 90% páratartalom mellett tartottuk. A sejtkultúrát 80 %-os konfluenciánál passzáltuk. Az MSC sejtkultúra tisztaságát áramlási citometriával vizsgáltuk, Mouse Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Marker Antibody Panel-t (R&D Systems) használva, a gyártó utasításainak betartásával.

***In vitro* kísérletek sejtkultúrái**

MSC sejtkultúrákat (6×10^4 cell/ml) második passzázsszámmal, $1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ sejtszámmal sejttenyésztő csészébe ültettük. A 24 órás inkubációt követően az MSC sejtkultúrákat B16F1 exoszómával kezeltük (40 µg/ml exoszómális fehérje tartalom; $1,5 \times 10^{11}$ exoszóma, 5 ml

tápoldatban), 24 óránként. A sejt kultúrákat 24, 48, 72 és 96 órára kezeltük, és a kezeléseket követően 24 órára gyűjtöttük le a sejteket a vizsgálati módszernek megfelelő eljárással.

Az exoszómális kezelés egér modellje

B16F1 sejteket intravénásan oltottunk (1×10^5 cell/100 μ l) C57BL/6N nőstény egerekbe. Egy hét elteltével a tumort hordozó egereket randomizáltuk, és 3 csoportba osztottuk (n=10/csoport). Az egerek intravénásan kontroll puffert (100 μ l), exoszómával kezelt MSC sejteket (1×10^5 cell/100 μ l), vagy exoszómát (40 μ g/100 μ l) kaptak a tumoros oltást követő 7., 8., 9., 10., 11. napokon. Egy héttel az első kezelést követően csoportonként 3 állatot kialtattunk és megvizsgáltunk. Eltávolítottuk az állatok tüdejét, fotó dokumentáltuk, majd -80 °C-on tároltuk a fehérje, mRNS és szövettani vizsgálatok elvégzéséig. A megmaradt állatokat további 10 nap eltelte után altattuk ki, vizsgáltuk meg, és távolítottuk el a tumoráttéteket. A kísérletet háromszor ismételtük meg.

A tüdő tumor borítottsága

A tüdők tumor borítottságát, az elkészült képek alapján ImageJ software segítségével határoztuk meg. Definiáltuk a tumoros és az egészséges régiók területének nagyságát, és kiszámoltuk a százalékos középértéket, SD és p értékeket a Microsoft Excel alkalmazásban.

A Chlamydia kezelés egér modellje

B16F1 sejteket intravénásan oltottunk (1×10^5 cell/100 μ l) immunkompetens C57BL/6N, illetve immundeficiens NOD/Scid IL2rg null (NSG) egerekbe. Egy hét elteltével a tumort hordozó egereket randomizáltuk, és 3 csoportba osztottuk (n=15/csoport). Az egereket Hep-2 sejtekben szaporított *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) CWL-029 törzsszel kezeltük. Mind a *C. pneumoniae* mind a mock kontroll (feldolgozott Hep-2 sejtek) 90 °C-on 30 percig voltak hőinaktívvá. Az egerek kezelését könnyű bódításban (nátrium-pentobarbitál 7,5 mg/ml) végeztük, intranazálisan 1×10^6 IFU *C. pneumoniae* oldattal, 7, 9, 11, 14, és 16 nappal a tumor oltását követően. Mivel az NSG egerek fizikai állapota extrém gyorsan romlott eutanáziában részesítettük őket a harmadik *C. pneumoniae* kezelést követően 14 nappal.

Ennek a modellnek a különleges előnyei: (i) a melanoma sejtek intravénás injekciójával látható melanoma tüdő áttétek alakulnak ki az injekció beadását követő 7 napon belül, anélkül, hogy jelentős mértékben terjednének más szervekbe; (ii) a *C. pneumoniae* egy tüdőspecifikus, intracelluláris kórokozó, amely még a tüdő melanoma áttétjeiben is jelentős inváziós sebességgel rendelkezik. Az inhalációs kezelést követően csoportonként 3 állatot altattunk ki, és a tüdejüket fehérje-, mRNS- és szövettani elemzés céljából gyűjtöttük össze. A fennmaradó egereken a túlélést vizsgáltunk. A kísérlet végén az állatokat eutanáziában részesítettük, a

tüdejüket eltávolítottuk, és 3 független személy, vak módon számolta a felületi áttéteket. A túlélési kísérletekhez az egércsoportokat a melanoma oltását követően ötször kezeltünk a leírtak szerint. A Kaplan-Meier túlélési görbéket log-rank statisztikai teszttel elemeztük, és a $p \leq 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Minden állatkísérletet az intézményi és a nemzeti állatjóléti bizottság engedélyezte.

Reagensok

A Western blot analízishez, és az immunfluoreszcens festéshez használt antitesteket részletesen az 1-es Táblázatban soroltuk fel.

Táblázat 1. Western-blot analízishez, és az immunfluoreszcens festéshez használt antitestek.				
antitest	klón	hígítás		kat. szám
rabbit anti-mouse CD63	poliklonális	1:1000	biorbyt	orb11317
hamster anti-mouse CD81	Eat-2(EAT)	1:100	LifeSpan Biosciences	LS-C106418
rabbit anti-mouse CD9	EPR2949	1:500	LifeSpan Biosciences	LS-C105676
mouse anti-mouse HSP70	C92F3A-5	1:8000	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-81
rat anti-mouse PD-1	RMP1-14	1:1000	Biolegend	114102
rabbit anti-mouse MLANA	poliklonális	1:200	biorbyt	orb247345
rat anti-mouse CD11b	M1/70	1:50	R&D Systems	MLDP5
goat anti-mouse CD80	poliklonális	1:100	R&D Systems	AF740
Alexa Fluor 555 conjugated anti-	poliklonális	1:500	ThermoFisher Scientific	A-21428
Alexa Fluor 647 conjugated anti-	poliklonális	1:100	Jackson	112-605-062
goat anti-rabbit-HRP	poliklonális	1:1000	R&D Systems	HAF008
goat anti-rat-HRP	poliklonális	1:1000	R&D Systems	HAF005
goat anti-Hamster-HRP	poliklonális	1:30000	ThermoFisher	PA1-29626
A sejtmagok festéséhez DAPI festéket használtunk (Life Technologies)				

Exoszóma izolálás és karakterizálás

Az exoszómákat B16F1 sejtkultúra felülszóból izoláltuk. A felülszókát elsőként 4 °C-on centrifugáltuk, 780 × g -vel 5 percig, és 3900 × g -vel 15 percig, majd 0,22 µm pórusméretű membránon szűrtük a sejtek, törmelékek és nagyobb vezikulák eltávolítása végett. Az exoszómákat ultracentrifugálással ülepítettük (150 000 × g, 60 min, 4 °C), a pelletet 2× mostuk DPBS-sel, majd DPBS-ben szuszpendáltuk fel. A B16F1 exoszóma-izolátumok fehérjekoncentrációját Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Scientific) segítségével mértük, majd atomerő-mikroszkópiával (atomic force microscopy – AFM), pásztázó elektronmikroszkópiával (scanning electron microscopy – SEM) és Western blot analízissel jellemeztük.

Az exoszómák miRNS-tartalmának elemzése

Az exoszóma izolátum miRNS-tartalmát a NucleoSpin miRNA izoláló kit (Macherey-Nagel) segítségével izoláltuk a gyártó instrukcióit követve. A szekvenálást egy SOLiD 5500xl készülékkel végeztük a gyártó protokollja szerint. A nyers adatok bioinformatikai analízise a

CLC Genomics Workbench 8.0.2 (Qiagen Bioinformatics) verziójával történt, ahol a miRBase 21. kiadásának annotált *Mus musculus* miRNS szekvenciáit használtuk referenciaként, és a 10, vagy annál több találattal rendelkező miRNS-eket fogadtuk el.

B16F1-eredetű exoszómák tömegspektrometriai analízise

A tömegspektrometriához (LC-MS/MS) a vezikuláris fehérjét (25 µg/minta) SDS-PAGE segítségével választottuk el, majd Coomassie-kékkel festettük. A gél mintánként 12 egyenlő részre vágtuk fel, a fehérjét a gélben emésztettük, majd a peptid-kivonatokat egy nanoHPLC (nanoAcquity, Waters) rendszerhez kapcsolt LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific) tömegspektrométerrel analizáltuk. A keresésre alkalmas listát a Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) segítségével állítottuk fel, majd az adatbázis lekereséshez saját Protein Prospector 5.14.1 keresőnket és az Uniprot adatbázis *Mus musculus* és *Bos taurus* szekvenciáit használtuk. A találatok közül, a legalább 3 peptiddel azonosított fehérjét fogadtuk el, de kizártuk a marhában és egerben azonos szekvenciájú peptideket. Az FDR értékek mindig 1% alatt voltak.

Western blot analízis

A fehérje mintákat 4x mintapufferben (NuPAGE®, ThermoFisher) szuszpendáltuk fel, és 4-12%-os Bis-Tris akrilamid gélen (ThermoFisher) méret szerint szeparáltuk, majd PVDF membránra (Merck) blottoltuk. Az immunreaktív jeleket ECL reagenssel (Advansta) tettük a LI-COR ODYSSEY® Fc (Dual-mode imaging system) rendszer által detektálhatóvá. Az exoszómákat jellemző fehérjék Western blottal történő azonosításához használt ellenanyagok a 1-es Táblázatban kerültek felsorolásra.

Citokinek és kemokinek kimutatása Proteome Profiling használatával

A tüdő mintákat NP40 lízis pufferben (Thermo Fisher Scientific) tártuk fel, és a fehérjekoncentrációkat Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Scientific) segítségével mértük meg. A különböző kemokinek és citokinek expressziós szintjét Mouse Cytokine Array Panel A (R&D Systems) felhasználásával azonosítottuk. Az immunreaktív jeleket a LI-COR ODYSSEY® Fc (Dual-mode imaging system) rendszerrel detektáltuk és az Image Studio Lite v5.2 szoftver segítségével azonosítottuk.

Kvantitatív valós idejű reverz transkripció PCR (qRT-PCR)

Mlana és Mitf qRT-PCR

A totál RNS tisztításához Quick-RNA MiniPrep izoláló kitet használtunk (Zymo Research). A cDNS könyvtárat a High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) és random

primerek felhasználásával hoztuk létre. A reakciókat FastStart SYBR Green Master keverékkel (Roche) végeztük.

A relatív expressziós arányokat az MmRpl27 (Mus musculus ribosomális protein L27) génhez viszonyított normalizált arányként számítottuk. A végső relatív génexpressziós arányokat $\Delta\Delta Ct$ értékeként számoltuk.

Negyven onkogén TaqMan panel analízise

Az MSC sejtekből Qiagen RNeasy Mini Kit segítségével RNS-t izoláltunk, a cDNS-t TaqMan reverz transzkripció reagensekkel szintetizáltuk. A tüdőszövetből a totál RNS-t TRIzol (ThermoFisher) alkalmazásával izoláltuk, és a High Capacity cDNS Kit (ThermoFisher) segítségével hoztuk létre a cDNS könyvtárat. TaqMan Gene Expression Master Mix-et (ThermoFisher) használtunk a qPCR kísérlethez. A vizsgált 44 gén expresszióját $\Delta\Delta Ct$ módszerrel számoltuk, és 4 belső kontroll (PPIA, 18S RNS, ACTB és GAPDH) átlagos Ct értékére normalizáltuk.

Az összefüggések elemzéséhez a hierarchikus klaszterelemzést, R szoftverrel végeztük. Az „alulról felfelé” épített agglomeratív hierarchikus klaszterezési stratégiát alkalmaztuk, és az eredményeket egy fa alapú dendrogramban ábrázoltuk. (R szoftver: R. D. C. Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistics Computing, Vienna, Austria, 2008).

Citokin és kemokin qRT-PCR

A tüdő totál RNS-ét NucleoSpin RNS II RNS izoláló kit alkalmazásával tisztítottuk; amiből cDNS-t szintetizáltunk. A qRT-PCR-t poolozott mintákon ($n = 3$) végeztük génspecifikus primerekkel (CCL2, CCL3, CD86, IL-12, IL-6, IL10, CXCL16, CCL7, CD80, CXCL11, CXCL9, IL23, TNF- α), és SYBR Green felhasználásával követtük a génexpressziót. Minden egyes Ct értéket normalizáltuk négy belső kontroll gén átlagos Ct értékére (ΔCt értékek). A végső relatív génexpressziós arányokat a ΔCt értékek ($\Delta\Delta Ct$ értékek) összehasonlításaként számítottuk ki.

Szövettan, immunhisztokémia

A tüdőmintákat 4% formaldehid oldatban fixáltuk; majd rutin HE szövettani vizsgálatot, valamint standardizált immunhisztokémiai szöveti analízist végeztük el az 1. táblázatban felsorolt antitestekkel.

Y-kromoszóma kimutatása tumoráttétben (FISH)

A fluoreszcens *in situ* hibridizációhoz (FISH) az X kromoszóma és az Y kontroll próbát (Empire Genomics) alkalmaztuk az egér MSC sejtek Y kromoszómájának jelenlétének ellenőrzésére.

Sejtprolifерáció

Az exoszóma kezelést követően 72 órával a kezeletlen kontroll és az exoszómának kitett MSC kultúrákat tripszinnel disszociáltuk a tenyésztő felületről. A sejteket tápoldattal mostuk, Bürker-kamrában és sejtszámlálóban (Bio-Rad, TC10 Automated Cell Counter) számláltuk.

Apoptózis kimutatása

Az exoszómáknak kitett MSC kultúrákat és a kontroll sejteket 100 ng / ml egér tumor nekrozis faktor- α -val (TNF- α) kezeltük (R&D Systems). 24 órás inkubálás után a sejtpusztulást az Annexin V apoptózis detektáló kit-tel határoztuk meg (Biolegend). A mintákat FACS Calibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) mértük, az adatokat Flowing Software (Cell Imaging Core) elemezte.

PD-1 és MLANA kimutatása immunfluoreszcens mikroszkóppal

Az MSC kultúrákat 4% paraformaldehiddel fixáltuk, TritonX-100 0,1%-os oldatával permeabilizáltuk, és BSA-val blokkoltuk. Az alkalmazott antitesteket az 1. táblázatban soroltuk fel. A képeket konfokális lézeres pásztázó mikroszkóppal (Olympus) és dSTORM szuperrezolúciós mikroszkóppal készítettük (egyedi gyártmányú, invertált mikroszkóppal, Nikon Eclipse Ti-E keret alapján).

Molekuláris hálózat ábrázolása az Ingenuity Pathway Analysis szoftverben

Az exoszómával kezelt állatokban *in vivo* túlexpresszált gének által kódolt fehérjék irodalmi adatai alapján felrajzoltunk egy fehérje hálózatot. Ennek a hálózatnak az egyedi grafikus ábrázolását az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Path Explorer eszközzel készítettük.

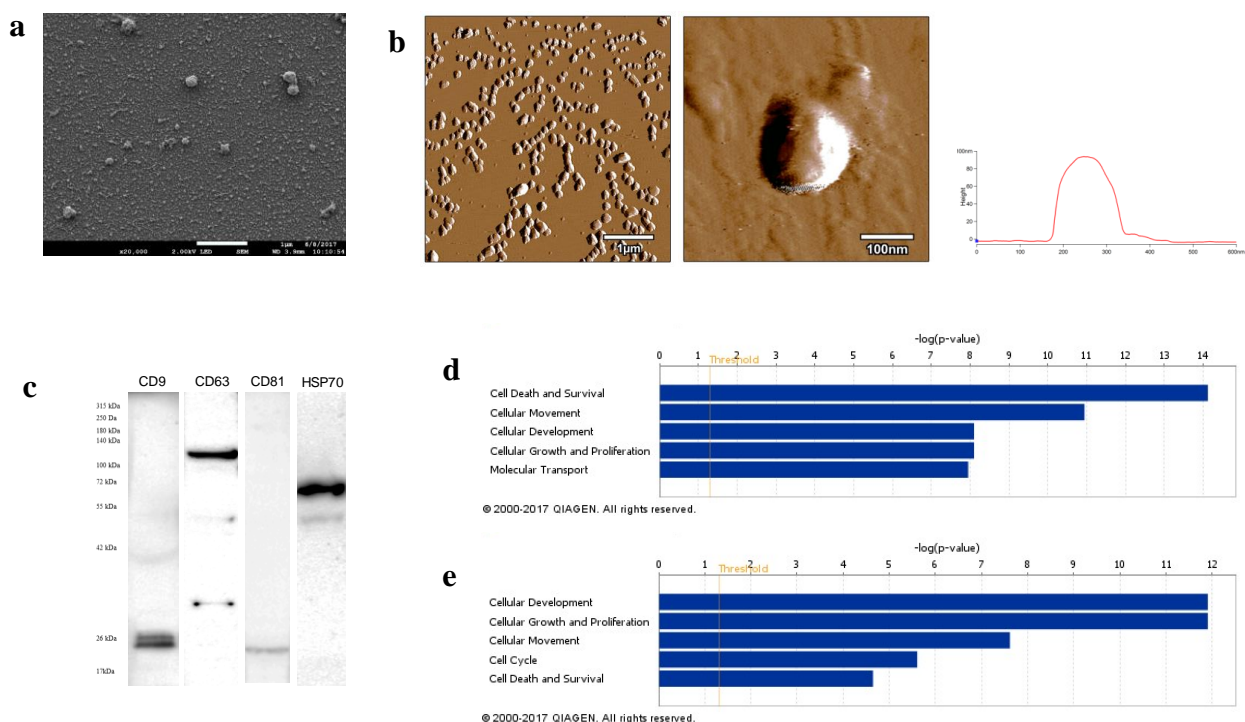
Statisztikai analízis

Az összes adatot átlag \pm SD vagy SEM formában ábrázoltuk legalább három független kísérlet eredményét felhasználva. A statisztikai paramétereket, beleértve a statisztikai elemzést, a statisztikai szignifikanciát és az n értékeket, az ábra jelmagyarázatai közlik. *In vivo* kísérletekhez n = állatok száma. Statisztikai összehasonlítás céljából kétmintás t-próbát hajtottunk végre. A $p \leq 0,05$ értéket szignifikánsnak tekintettük (* $p \leq 0,05$; nem szignifikáns [n.s.]).

4. Eredmények

A B16F1 eredetű vezikulák izolálása, és karakterizálása

Elsőként B16F1 egér melanoma sejtekből származó EV-ket differenciálszűréssel és ultracentrifugálással izoláltunk, majd a vezikulákat a *MISEV2018* alapján jellemeztük. Az eredmények alapján az izolált vezikulák alakja, mérete, valamint a fehérje összetétele exoszómális jellemzőket mutatott (2. ábra).



2. ábra. A B16F1 melanoma sejtkultúrából származó exoszómák jellemzése.

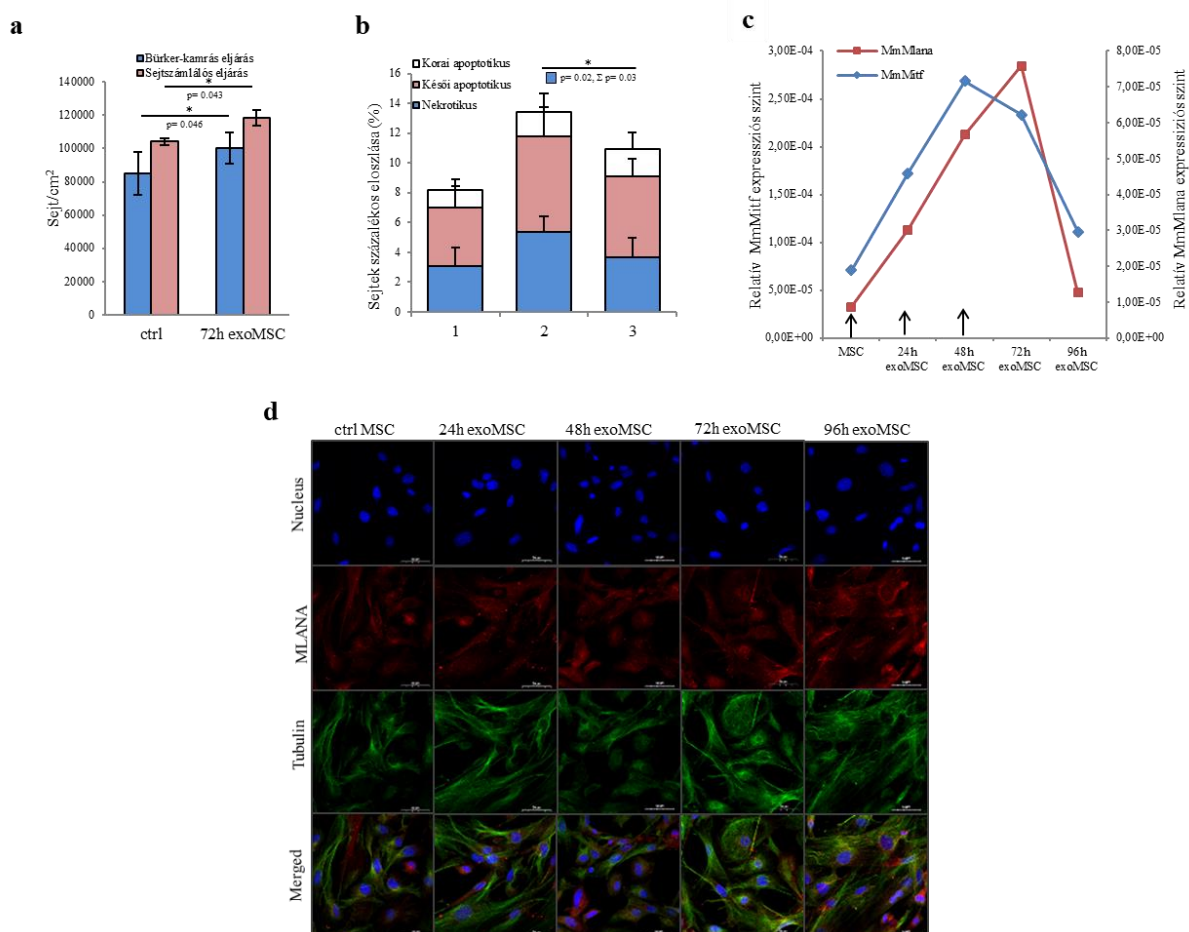
(a) A melanoma sejtek által kiválasztott exoszómák SEM képe. (b) Az exoszómák AFM felvétele. (c) Az általános exoszóma markerek Western blot analízise. (d és e) Az exoszómális fehérjék és miRNS-ek az IPA által azonosított top 5 molekuláris és sejtes funkció.

Az izolált exoszómáknak meghatároztuk a fehérje- és miRNS-profilját. A teljes proteom elemzés során a melanoma exoszómákban 95 különböző fehérjét, a miRNS-szekvenálással 168 ismert miRNS-t azonosítottunk.

A proteomikai és miRNS szekvenálási adatok funkcionális jelentőségének megismeréséhez IPA szoftvert használtunk. Az IPA elemzés kimutatta, hogy az azonosított fehérjék nagy valószínűséggel olyan sejtes és molekuláris folyamatokban vesznek részt, mint a „Sejtpusztulás és túlélés”, „Sejtmozgás”, „Sejtek közötti jelátvitel és kölcsönhatás”, „Sejtnövekedés és -szaporodás” és „Sejt Morfológia” (2d. ábra). Ezekkel az eredményekkel összeeszenek az IPA analízissel azonosított miRNS funkciók, mint a „Sejtfejlődés”, „Sejtnövekedés és -szaporodás”, „Sejtmozgás”, „Sejtciklus” és „Sejtpusztulás és proliferáció” (2e. ábra).

A tumor eredetű exoszómák az MSC sejtek onkogén átprogramozását eredményezték *in vitro*

Ezt követően megvizsgáltuk az exoszómák hatását az MSC sejtek biológiai folyamataira, mely sejtek a tumor-sztróma általánosan elfogadott elemei az *in vitro* modellekben.



3. ábra. Az internalizált melanoma exoszómák az MSC sejtek rosszindulatú transzformációját indukálják.

a) Exoszómával kezelt MSC kultúra sejtproliferációs vizsgálata. A sejtek egy részét exoszómával kezeltük, és 72 órával a kezelést követően a sejtszám szignifikánsan megnövekedett a kezeletlen sejt kultúrákhoz képest. Az eredményeket átlag \pm SD ($n = 3$) formájában adjuk meg. **(b)** Az exoszómának kitett MSC sejtek apoptózis-elemzése áramlási citometriával. Mind a TNF- α által indukált teljes sejthalál (Σ), mind a nekrosis szignifikánsan alacsonyabb volt ($\Sigma p = 0,03$, illetve $p = 0,02$) az exoszómával előkezelt sejtenyészetekben a megfelelő kontroll sejtekhez képest. Az eredményeket átlag \pm SD ($n = 3$) formájában ábrázoltuk. **(c)** Mlana és Mitf qRT-PCR vizsgálata a 24 óránként exoszómákkal kezelt MSC kultúrákban, a kezeléseket a grafikonon nyilak jelezik. Mindkét mRNS expressziója növekedett exoszóma kezelés után, de eltérő kinetikával. **(d)** A MLANA fluoreszcens immunocitokémiája exoszómával kezelt MSC kultúrákban, AlexaFluor555-konjugált antitestet alkalmazva (vörös). A sejtek α -tubulin hálózátát AlexaFluor488-konjugált antitest (zöld) jelölte, és a sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük.

Megállapítottuk, hogy az MSC-k proliferációs sebessége jelentősen felgyorsult 72 órával az exoszóma kezelést követően (3a. ábra). Az áramlási citometria azt is kimutatta, hogy az exoszómával kezelt MSC sejtek részleges rezisztenciát mutattak a 100 ng / ml TNF- α sejthalált

kiváltó hatásaival szemben, az elhalt sejtek frakciója jelentősen csökkent ezekben a sejt kultúrákban (ábra (3b)).

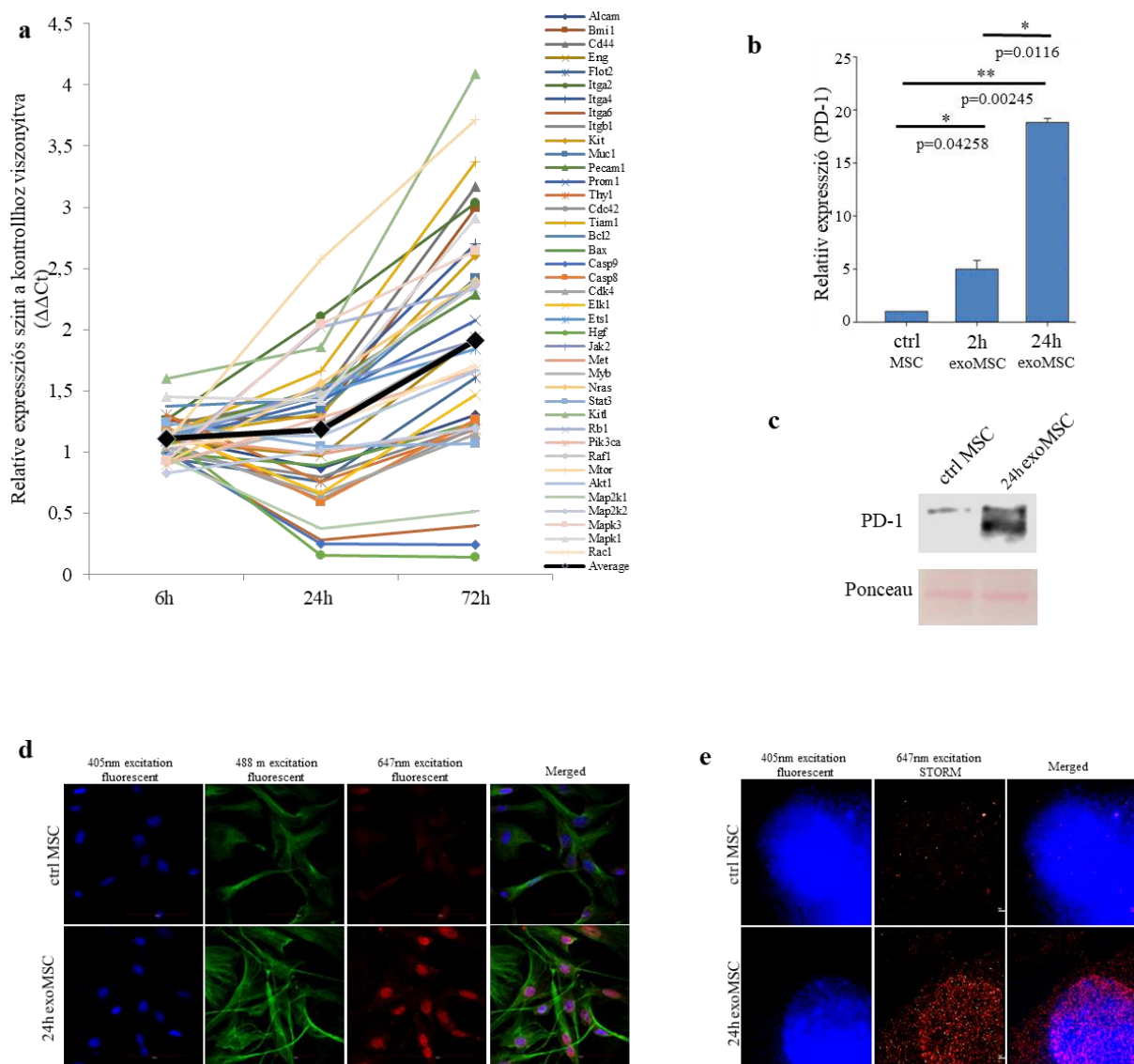
Mivel az exoszómák melanoma sejt eredetűek, kérdés volt, hogy a melanoma-specifikus tulajdonságok *de novo* megjelennek-e exoszómális hatásra a kezelt MSC sejtekben. A kérdés megválaszolásához vizsgáltuk az Mlna és az Mitf melanoma-specifikus markerek expresszióját. qRT-PCR vizsgálat eredményeként azt láttuk, hogy mindkét marker mRNS-transzkriptum szintje szignifikánsan megemelkedett az MSC sejtekben az exoszóma kezelés során (3c. ábra). Az immunfluoreszcens analízis megerősítette, hogy az exoszóma expozíció jelentősen megnövelte az MLANA expresszióját fehérjeszinten is (3d. ábra).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az exoszómák fent leírt hatásai – amelyek az MSC sejtek rosszindulatú transzformációját indukálják – mellett leírható-e a célsejtek molekuláris onkogén átprogramozása. Az exoszómával kezelt MSC kultúrákat egy 40 – irodalmi adatok alapján melanoma progresszióban szerepet játszó – onkogénből és tumorszuppresszor génből álló saját tervezésű panel segítségével, qRT-PCR módszerrel vizsgáltuk.

Amint a 4a. ábra mutatja, a melanoma exoszómákkal kezelt MSC sejtek génexpressziós mintázata egyértelmű onkogén dominanciát mutatott (a kezeletlen sejtekhez képest). Ezt az összes vizsgált molekula átlagos, relatív génexpressziós szintjének statisztikai elemzésével igazoltuk. Statisztikailag magasabb értékeket kaptunk az exoszómával kezelt sejtek esetében ($p = 1,9 \times 10^{-5}$, $p = 0,031$ és $p = 2,3 \times 10^{-8}$ a 6, 24 és 72 órás időpontokban).

Mint fent említettem, a közelmúltban egy tanulmány leírta, hogy a PD-1 receptort túlexpresszáló melanomasejt-alpopulációk figyelemre méltóan megnövekedett invazivitást és agresszív növekedési tulajdonságokat mutatnak. Az előzetes eredményeink alapján, mely szerint a melanoma exoszómák képesek MSC sejtek rosszindulatú "átnevelésére", megvizsgáltuk a PD-1 expressziót a kezelt MSC kultúrákban.

A várakozásoknak megfelelően a kontroll, kezeletlen MSC sejtekben csak kismértékű PD-1 expressziót lehetett azonosítani (mind mRNS, mind fehérje szinten). Ezzel szemben a PD-1 expresszió szignifikáns és időfüggő emelkedését mutattuk ki az exoszómával kezelt sejtekben qRT-PCR-rel (4b. ábra), Western-blot-vizsgálattal és immunocitokémiai analízissel (4c,d. ábra). Ezen kívül STORM, szuperrezolúciós mikroszkópia segítségével egyedi molekulák szintjén is azonosítani tudtuk a PD-1 nagymértékű túltermelődését az exoszómával kezelt MSC sejtekben (4e. ábra).



4. ábra. Az exoszómák által átnevelt MSC sejtek onkogén dominanciát és PD-1 expressziót mutatnak.

(a) Negyven tumoros folyamatokkal kapcsolatos gén qRT-PCR analízise exoszómával kezelt MSC sejtekben, saját tervezésű panelen. A megváltozott génexpressziós mintázat trendvonala 24 óra elteltével növekvő tendenciát mutat (átlag \pm SD). (b) PD-1 receptor qRT-PCR elemzése MSC sejtekben 2 és 24 órás exoszóma-expozíció elteltével. A grafikon az átlag + SEM ($n = 3$) értékét mutatja. (c) A PD-1 expressziójának reprezentatív immunoblottja kontroll és exoszómával exponált MSC sejtizátumokban, 24 órás exoszóma kezelést követően. (d, e) A PD-1 fluoreszcens immuncitokémiája 24 órás exoszóma hatásnak kitett MSC kultúrákban, a PD-1 molekula (vörös) elleni antitest alkalmazásával. A sejtmagokat DAPI-val festettük. (d) a sejtek α -tubulin hálózatát zölden jelöltük. (e) A képeket STORM szuperrezolúciós mikroszkóppal készítettük.

Fontos megemlíteni, hogy mivel a proteomikai elemzés nem határozta meg a PD-1 jelenlétét az exoszómákban, ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az exoszómáknak kitett MSC sejtekben a magas PD-1 fehérjetartalom a *de novo* indukciónak és nem az exoszómák által közvetített molekuláris transzfernek az eredménye. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a sejtek melanoma exoszómák által közvetített "átnevelése" új MSC-populációt eredményezett, amely MSC^{PD-1+} -ként azonosítható.

A B16F1 exoszómák fokozzák az *in vivo* tumorgenezist és a tumor progresszióját

Miután igazoltuk, hogy a tumor eredetű exoszómák az MSC sejtek onkogén átprogramozását eredményezik *in vitro*, feltételeztük, hogy ez a jelenség *in vivo* is leírható. Ennek a feltételezésnek a vizsgálatára egy jól ismert állatmodellt alkalmaztunk, amelyben B16F1 melanoma sejtek egerekbe történő intravénás beadásával (a farokvénába) – többnyire a tüdőben – daganatok kialakulását indukáltuk. Ezeket a daganatos egereket ezután pufferral, vagy ugyanazon a B16F1 melanoma sejtekből származó exoszómákkal, vagy exoszómák által indukált, MSC^{PD-1+} sejtekkel oltottuk be.

Az exoszómával-rokon csoportokat (azaz exoszómával, vagy MSC^{PD-1+}sejtekkel kezelt csoportokat) a tumorral borított tüdőszövetek jelentősen megnövekedett mérete jellemezte (5a. ábra). Továbbá, mindkét exoszómával-rokon csoportban a távoli áttétek száma szignifikánsan megemelkedett a kontrollhoz képest (5b. ábra). Az MSC^{PD-1+} sejtekkel kezelt egerekben az MSC sejteket azonosítani lehetett a para-aorta nyirokcsomókban FISH segítségével (5c. ábra), igazolva az MSC^{PD-1+} sejtek sikeres *in vivo* adhézióját.

A különböző csoportok tüdőszövegeteit részletes expressziós profilozásnak vetettük alá 14 nappal az exoszómák, vagy az MSC^{PD-1+} sejtek beoltását követően. A qRT-PCR elemzést egy 40 génből álló, saját tervezésű panel segítségével végeztük el.

A génexpressziós minták hierarchikus klaszteranalízise (HCA) egyértelműen robusztus proto-onkogén dominanciát mutatott az exoszómával-rokon csoportok tüdőmintáiban, összehasonlítva a kontroll szövetekkel (5d. ábra).

Igazoltuk, hogy a fenti gének mellett a PD-1 expressziója is szignifikánsan megnövekedett mindkét exoszómával-rokon csoportban (5e. ábra). Meg kell jegyezni, hogy bár a PD-1 mRNS-transzkriptum szintje megközelítőleg kétszerese az MSC^{PD-1+} sejtekkel kezelt állatok tüdőszövetében az exoszómával kezelt csoportba tartozó tüdőmintákhoz képest, a különbség nem volt szignifikáns (valószínűleg az állatok közötti nagy változékonyság és a standard hiba miatt).

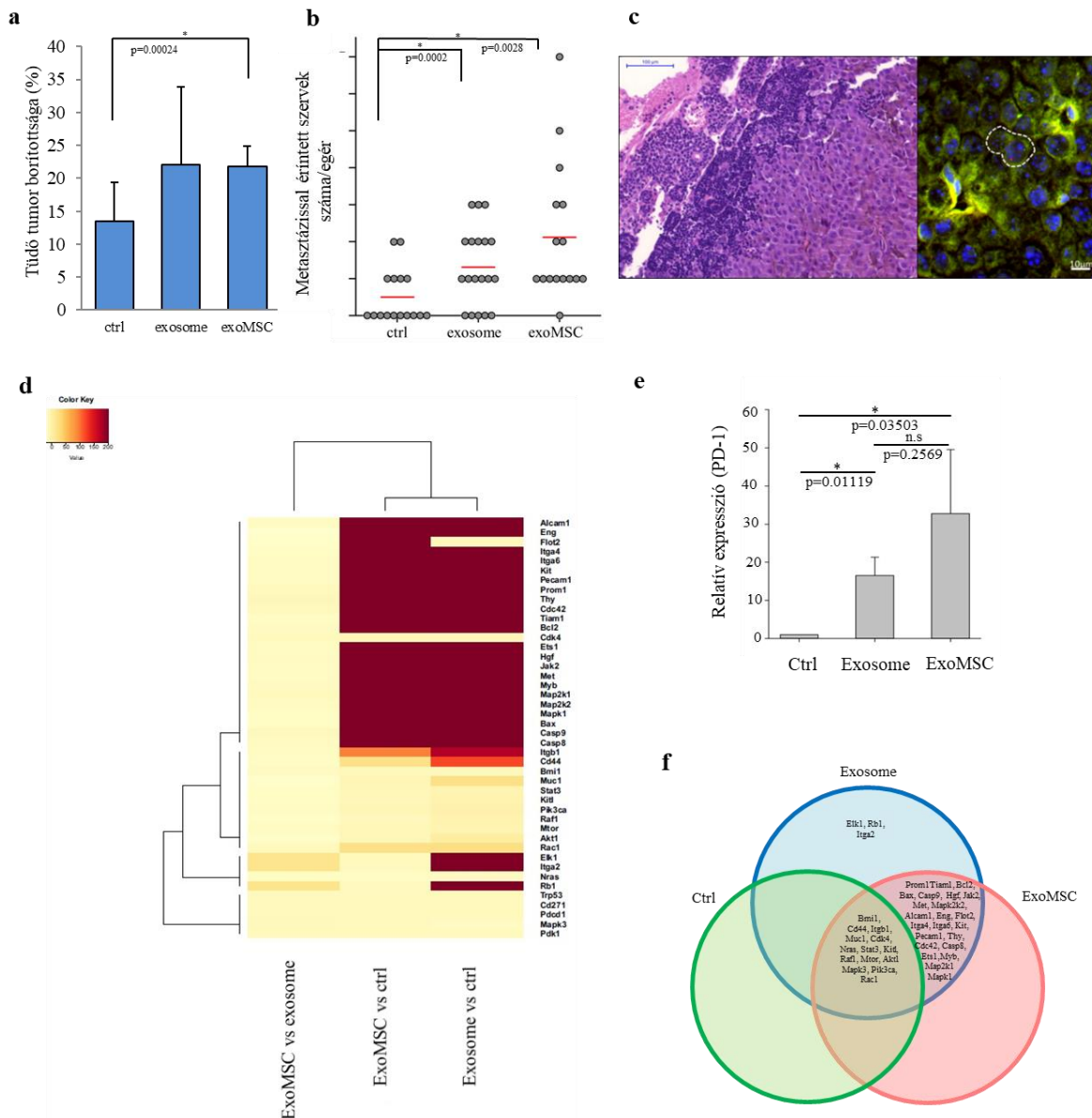
A különféle génexpressziós mintázatok közötti lehetséges logikai kapcsolatok bemutatására egy Venn-diagrammot (5f. ábra) rajzoltunk fel.

A következő génexpressziós mintákat határoztuk meg:

- három gén (Elk1, Rb1, Igta2) expressziós szintje kizárólag az exoszómával kezelt csoportban emelkedett;
- huszonhárom gén (Prom1, Tiam1, Bcl2, Bax, Casp9, Hgf, Jak2, Met, Mapk2k2, Alcam1, Eng, Flot2, Itga4, Itga6, Kit, Pecam1, Thy, Cdc42, Casp8, Ets1, Myb, Map2k1, A Mapk1) mind az

exoszóma-csoportban, mind az MSC^{PD-1+} sejtekkel kezelt csoportban emelkedett expressziós szintet mutatott;

- tizennégy gént (Bmi1, Cd44, Itgb1, Muc1, Cdk4, Nras, Sat3, Kitl, Raf1, Mtor, Akt1, Mapk3, Pik3ca, Rac1) találtunk mindhárom csoportban upreguláltnak.



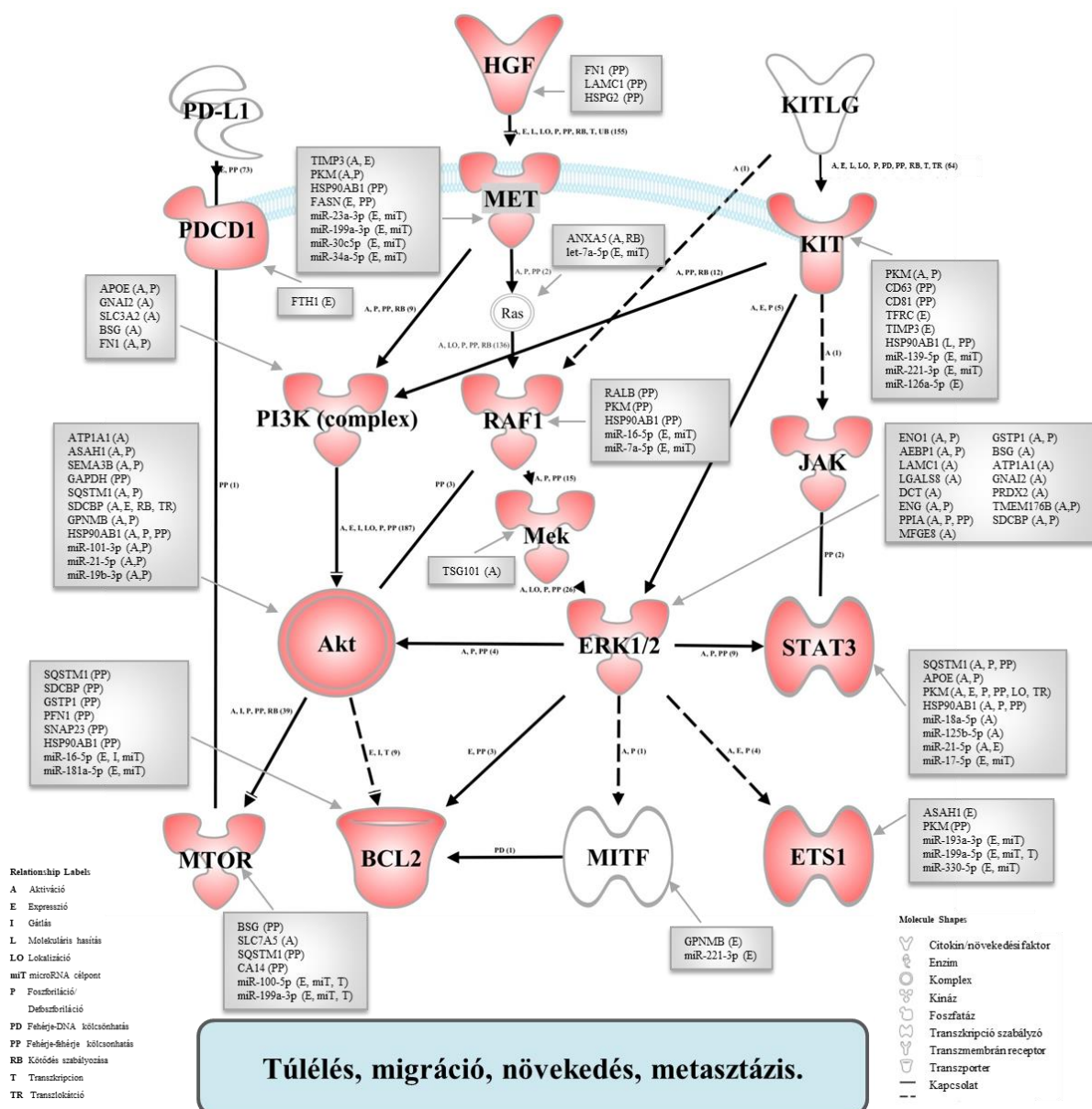
5. ábra. **A melanoma exoszómák elősegítik a tumor progresszióját és az áttétképződést in vivo.**

(a) A tüdő tumorborítottsága a 15. napon a három különböző állatcsoportban. A grafikon az átlag + SD (n = 3) értéket mutatja. (b) A távoli áttétek száma a 25. napon. Egy pont minden csoportban egy-egy állatot jelöl, a piros vonalak az állatonkénti átlagos áttétek számát mutatják. (c) Para-aorta nyirokcsomó-metasztázisok FISH-elemzése, amely exoszómával kezelt MSC-k jelenlétét mutatta. A hím egér eredetű MSC Y-kromoszómáját (vörös pont) detektáltuk egy nőstény egér áttéteiben. (d) A génexpressziós minta heatmap-je és klaszteranalízise, amelyek protoonkogén dominanciát mutatnak az exoszóma vagy az MSC^{PD-1+} csoportokban. (e) a PD-1 qRT-PCR analízise a tüdőmintákban TaqMan szondákkal (n = 3). (f) A Venn-diagram a különféle génexpressziós mintázatok közötti lehetséges logikai kapcsolatokat mutatja be.

Végül meg kell jegyezni, hogy az exoszómával-rokon csoportokban tapasztalt génexpressziós változások kizárólag az exoszómák jelenlétének voltak köszönhetők, mivel a „csak MSC^{PD-1+}” klaszter nem tartalmazott gént (5f. ábra).

A melanoma eredetű exoszómák elősegítik a tumorgenezist és a sejtek túlélési jelátviteli útját

A 6. ábra az interakciós utak térképét mutatja az *in vivo* kísérletekből származó, túlexpresszált molekulák (vörös szimbólumok) alapján. Három fő útvonalból észleltünk megnövekedett expressziós szintű molekulákat, amelyek részt vesznek a tumor progressziójában és az áttétképződésben.



6. ábra. Az *in vivo* túlexpresszált gének integrált, asszociatív hálózata, az egymással kölcsönhatásban lévő exoszómális faktorokkal kiegészítve.

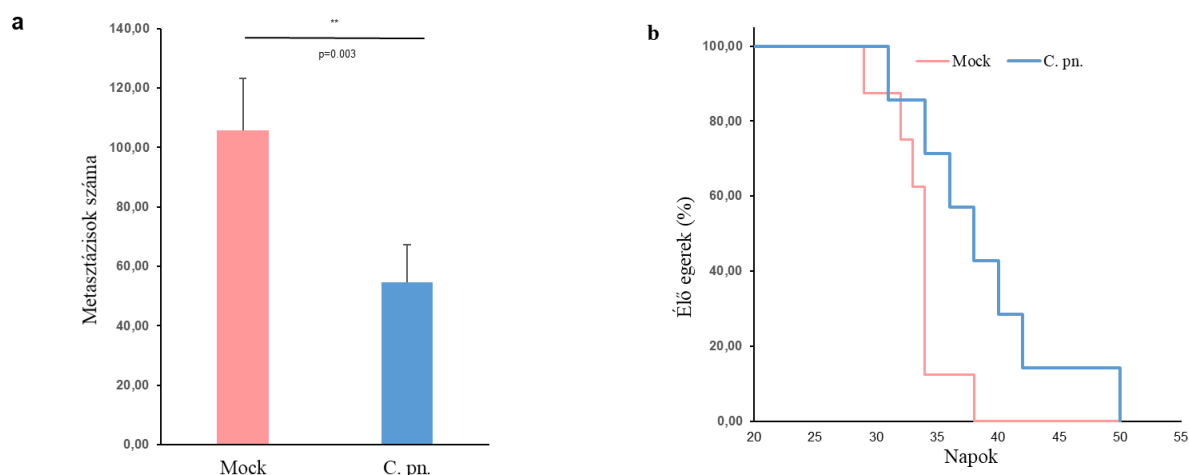
Irodalmi adatok alapján, a túlexpresszált gének (vörös szimbólumok) felhasználásával létrehoztunk ezt a hálózati ábrát. A molekulák közötti kapcsolatokat az IPA adatbázis is igazolta. A hálózati vizualizáció az IPA Path Designer Path Explorer szoftverrel segítségével történt. Az exoszómális fehérjéket és a miRNS-eket (szürke dobozok) az IPA Path Designer Grow alkalmazásával kapcsoltuk össze a hálózat elemeivel, az IPA adatbázisban található kísérleti eredmények alapján. A kialakult hálózat alapján exoszómális komponensekkel történő aktiválás támogathatja a tumorsejtek túlélését, migrációját, növekedését és áttétképző sajátosságát.

Az interakciós térképet az IPA Path Designer Grow alkalmazás segítségével hoztunk létre, amely tartalmazza a túlexpresszált gének által kódolt fehérjéket (vagy azokból kialakult komplexeket), valamint az exoszómális miRNS-eket és fehérjéket (szürke dobozok), amelyekről korábban kimutatták, hogy szabályozzák vagy befolyásolják a jelölt molekulákat. Ezek a megállapítások azt mutatják, hogy az exoszómák és az MSC sejtek közötti kölcsönhatás tumorszerű fenotípust indukál a naïve MSC sejtek PD-1 túltermelésével *in vitro* és gyors tumor progresszióval *in vivo*.

Másrésről, megvizsgáltuk a melanoma TME-t a tumorba beszivárgó immunsejtek szempontjából, és igazoltuk, hogy a bakteriális fertőzés komplex tumorelles immunválaszt indukálhat.

Az immunkompetens egerek *C. pneumoniae*-val történő kezelése csökkenti a tüdőáttétek számát és növeli a túlélést

A tumorasszociált makrofágok szerepének tisztázása érdekében metasztatikus melanoma kialakulását generáltuk immunkompetens C57BL/6 egerekben vagy immunhiányos NSG egerekben, majd a *C. pneumoniae* kezeléssel tumorelles immunmechanizmusokat indukáltunk. A B16F1 melanoma sejteket intravénásan adtuk 6-8 hetes nőstény C57BL/6 immunkompetens, vagy immunhiányos NSG egereknek. Egy héttel a tumorsejt beadását követően az egereket hőinaktivált *C. pneumoniae*, vagy mock (negatív kontroll) szuszpenzióval kezeltük. Immunkompetens állatokban a tüdőáttétek száma szignifikánsan csökkent ($p = 0,003$, 3 független kísérlet) az inaktivált *C. pneumoniae* szuszpenzióval kezelt csoportban, negatív kontrollhoz képest (7a. ábra). Ezenkívül az inaktivált *C. pneumoniae* szuszpenzióval kezelt egerek (7b. ábra) túlélése jelentősen megnőtt ($p = 0,04$, 3 független kísérlet).

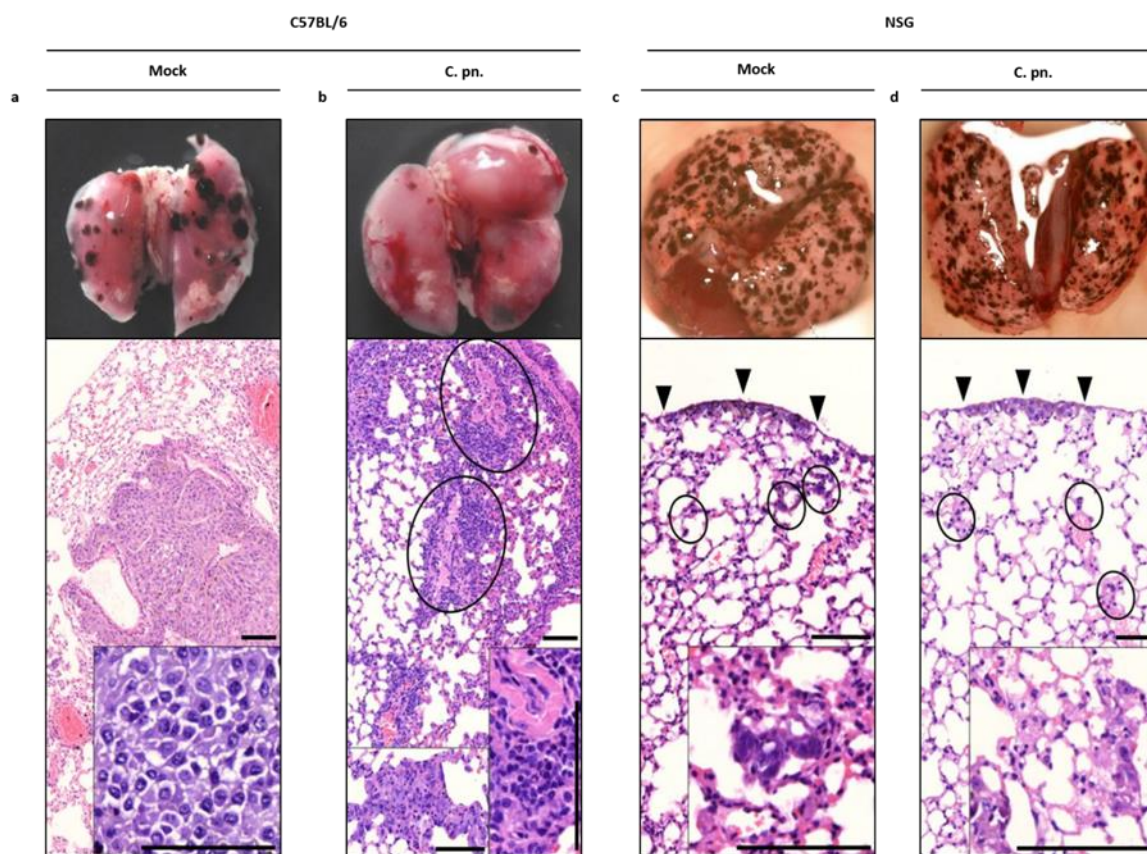


7. ábra. A *C. pneumoniae* kezelés melanoma metasztázis regressziót eredményez és növeli az állatok túlélését. (a) A tüdőáttétek száma, és (b) a túlélési arány a mock, illetve *C. pneumoniae* (C. pn.) szuszpenzióval kezelt immunkompetens C57BL/6 egerekben.

Az immunhiányos egerekben ez nem volt megfigyelhető, ami utal az immunválasz tumorelles szerepére.

A *C. pneumoniae* kezelés tumor regressziót és immunsejt-infiltrációt indukál

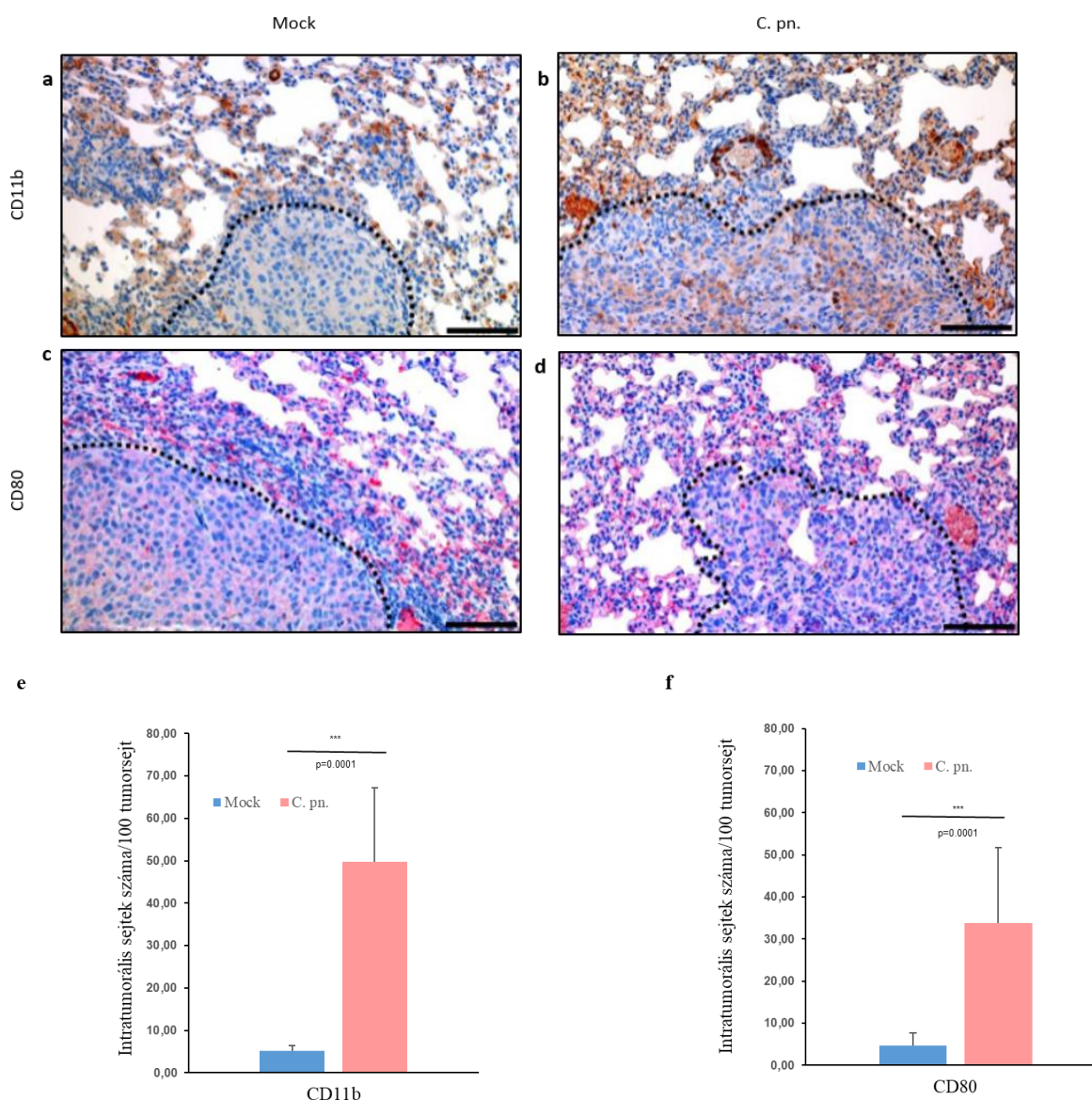
A mock kezelt melanoma áttétes immunkompetens C57BL/6 egerek tüdőszöveti metszetein nagyszámú áttét volt megfigyelhető, gyakori tumoron belüli nekrozissal, magas tumorterheléssel együtt (8a. ábra). Ezzel szemben a regresszív metasztázisok kisebb gócait figyeltük meg a *C. pneumoniae* szuszpenzióval kezelt immunkompetens állatokban (8b. ábra). Ebben a csoportban a regresszív metasztázisokban nagyszámú, a daganatot infiltráló mononukleáris hisztocitákat és limfoid sejteket azonosítottunk a mock szuszpenzióval kezelt mintákkal szemben. Ezzel ellentétben mind a mock, mind a *C. pneumoniae* szuszpenzióval kezelt immunhiányos NSG egerekben az áttétek többnyire szubpleurális és intraparenchymás lokalizációt mutattak, és szignifikáns intratumorális immunreakció nem volt megfigyelhető (8c,d. ábra).



8. ábra. A *C. pneumoniae* kezelés tumor regressziót és immunsejt-infiltrációt indukál.

Reprezentatív fotók és HE-festett szövettani metszetek (a) a mock és (b) a *C. pneumoniae* kezelt immunkompetens egerek tüdejéből, valamint (c) a mock és (d) a *C. pneumoniae* kezelt immunhiányos (NSG) állatok tüdejéből. Méretskála 100 μ m. (a) A trofikus nekrozisok magas tumorterhelésre utalnak. Belső négyzet: atipikus daganatos sejtek és a nekrotikus régiói. (b) A körök (jobb szélén nagyításban) jelzik a regresszív áttétek gócait, bal szélén: a *C. pneumoniae* kezelés után maradó tüdőgyulladás területei. (c, d) Mind a mock, mind a *C. pneumoniae* kezelt NSG egereknél áttétek fejlődtek subpleuralisan (nyílhegyek) és intraparenchymálisan (körök) anélkül, hogy jelentős gyulladásos reakciók történtek volna (belső négyzetek: az intraparenchymás metasztázisok nagyítása).

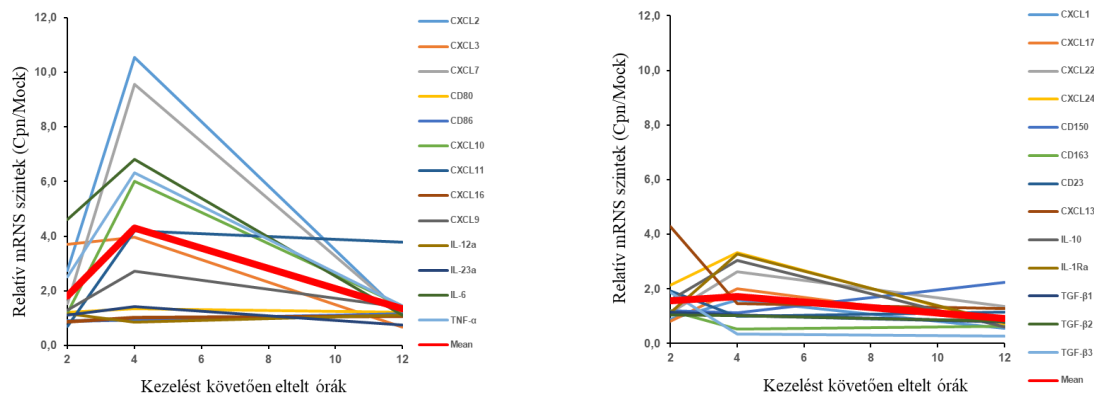
A *C. pneumoniae* szuszpenzióval kezelt melanomát hordozó C57BL/6 egerek tüdejében határozottan megnövekedett immunreakciót a CD11b és CD80 sejtfelszíni aktivációs markerek immunjelölésével is igazoltuk (9. ábra). Az immunsejtek invázióját nem észleltük a kontrollcsoportban, ahol az immunsejtek főként a daganatok marginális zónáiban koncentráálódtak (9a,c. ábra). A *C. pneumoniae* szuszpenzióval kezelt állatok tumorsztrómájában azonban jelentős módon megnövekedett a beszűrődő, aktivált (azaz CD11b és CD80 pozitív) limfociták száma (9b. ábra) a csoportok közötti különbség mindkét esetben jelentős (9e,f. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy *C. pneumoniae* kezelés M1 típusú makrofág polarizációt indukál.



9. ábra. A *C. pneumoniae* kezelés CD11b+ és CD80+ immunsejt-infiltrációt eredményez a tumorszövetekben. A CD11b (a, b, DAB, barna) és a CD80 (c, d, Fast Red) immunhisztokémiája a mock (a, c) és a *C. pneumoniae* (b, d) kezelt C57BL/6 egerek tüdejében. Szaggatott vonalak jelzik a tumor határát. (a-d). A CD11b+ (e) és CD80+ (f) sejtek száma intratumorálisan 100 tumorsejtre vonatkoztatva lett meghatározva. (e, f) Az adatokat átlag +SD-ként fejezzük ki.

A *C. pneumoniae* kezelés indukálja a makrofág differenciálódás eltolódását az M1 fenotípus felé

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a *C. pneumoniae* kezelés indukálta-e a makrofág polarizációt. Ennek érdekében feltérképeztük a citokin és kemokin transzkriptum profilokat, feltérképeztük a tumort hordozó immunkompetens egerek M1 (tumorellenes) vagy M2 (pro tumor) típusú makrofág karakterisztikáit. Az M1 és M2 típusú makrofág markereket qRT-PCR-rel detektáltuk poolozott tüdőmintákból (3 állat / pool) 2, 4 és 12 órával a mock illetve *C. pneumoniae* kezelés után. Négy órával a *C. pneumoniae* kezelést követően a CCL2, CCL3, IL-6, CXCL10, CCL7, CD80, CXCL11, CXCL9, IL-23 és TNF- α (M1 típusú makrofág polarizációs markerek) specifikus mRNS-transzkriptumainak szignifikáns emelkedését mutattuk ki (10a. ábra). Ezzel párhuzamosan a CD163, CCL1, TGF- β és IL-10 (M2 típusú makrofág markerek) mRNS expressziója csökkent a kezelés hatására; míg egyes, fontos M2 markerek (CXCL13, IL-1Ra) szintje nőtt (10b. ábra). A statisztikai elemzés feltárta, hogy a *C. pneumoniae* kezelést követően az M1 típusú citokinek és kemokinek transzkriptumainak mennyisége 4 óra elteltével szignifikánsan megemelkedett ($p = 0,014$) (10a. ábra) az M2 típusú makrofág markerekhez képest (10b.á).



10. ábra. A *C. pneumoniae* kezelés M1 típusú makrofág polarizációt indukál.

(a) Az M1 típusú citokin/kemokin specifikus mRNS transzkriptumok szintjének relatív változásai a *C. pneumoniae* (C. pn.) kezelt egerekben a mock kezelést kapott tumoros egerek tüdőmintáihoz viszonyítva. (b) az M2 relatív citokin/kemokin mRNS expressziójának átlagértékei; a kezelést követően 4 órával az M1 és az M2 szintje jelentősen eltér (kétmintás t-teszt).

5. Diszkusszió

A korábbi tanulmányok főként a tumor progressziójában és az áttétképzésben szerepet játszó belső és külső tényezők meghatározására fókuszáltak. Mára a tumor evolúciójának és a metasztázis képzésnek a megközelítése eltolódott, a korábbinál nagyobb hangsúlyt nyert a külső tényezők jelentősége mind a tumor progresszióban, mind a tumor regresszióban. Munkánk célja volt megérteni, hogy a TME milyen szerepet játszik ezekben a folyamatokban. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához melanoma modellen vizsgáltuk a szekretált exoszómák szerepét a TME sejteinek átnevelésében, és a PME kialakulásában. Ezenkívül vizsgáltuk a bakteriális antigének makrofág polarizációra gyakorolt hatását a daganatellenes immunválaszokban.

Ebben a munkában bizonyítottuk, hogy az MSC sejteket – melyek nagy mennyiségben megtalálhatóak a tumor-sztrómában, és az egészséges szövetekben egyaránt – a tumorsejtek, exoszómák közvetítésével képesek átnevelni.

Az átnevelési folyamat során a tumoros sejtvonalra jellemző válaszmintázat aktiválódik. Sikerült (i) azonosítani a sejtes és molekuláris szignálokat, amelyek melanoma eredetű exoszóma közvetítésével aktiválódnak a rosszindulatú irányba transzformálódó MSC kultúrában; (ii) leírni a melanoma eredetű exoszóma által kiváltott tumor progressziót; (iii) és kimutatni a PD-1 receptor – melanoma progressziós marker, és terápiás célpont – expressziójának változását, melanoma eredetű exoszómával történt kezelés következtében.

Az áttétképzés kritikus fázisa a melanoma progressziónak, továbbra is ez a melanoma fő halálozási oka, és terápiás szempontból a legfőbb kihívás. Ebben a tanulmányban rávilágítottunk a melanoma eredetű exoszómák egyre egyértelműbb szerepére a PMN kialakulásában.

A kísérleteink során az inaktivált intracelluláris patogén, *C. pneumoniae* kezelés hatására jelentős tumor regresszió történt a melanoma tüdőáttétekben, ami arra enged következtetni, hogy ez a kórokozó szerepet játszhat a tumor regressziójában a tumorellenes makrofág polarizáció indukcióján keresztül. Általánosan elfogadott, hogy a tumorellenes immunfolyamatok átfednek az antibakteriális immunválasszal. A makrofágok az immunválasz kulcsszereplői, melyek M1 típusú polarizációja közvetíti az immunrendszer tumorellenes hatását. Ebben a tanulmányban bebizonyítottuk, hogy a hővel inaktivált baktériumkezelés komplex tumorellenes immunválaszt indukálhat. A *C. pneumoniae* kezelés csökkentette az áttétképződést (ezáltal a hosszabb túlélést biztosítva) immunkompetens állatokban, míg immunhiányos egerekben ez nem volt megfigyelhető. Amint azt a citokin/kemokin profilok

mutatják, a *C. pneumoniae* kezelés indukálta az M1 típusú makrofág polarizációt, és jelentősen csökkentette az M2 típusú makrofágok szintjét a tüdő metasztázisában.

Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy az antimikrobiális immunválasz hozzájárul a tumorellenes hatáshoz.

6. Új eredmények

1. A melanoma eredetű exoszómák átprogramozzák az őket felvevő naïve mezenhimális sztróma sejteket, onkogén molekuláris folyamatok bekapcsolásával a sejtek rosszindulatú transzformációját indítva el.
2. A melanoma eredetű exoszómák a mezenhimális sztróma sejtekből egy melanoma-szerű, PD-1 receptort túltermelő sejtpopuláció (MSC^{PD-1+}) kialakulását eredményezik.
3. Mind a melanoma eredetű exoszómák, mind az általuk átnevelt melanoma-szerű MSC^{PD-1+} sejtpopuláció a tumor progresszióját támogatják, valamint onkogén molekulák túltermelését indukálva elősegítik a metasztázisok kialakulását *in vivo*.
4. A bakteriális antigének által kiváltott makrofág polarizáció és a komplex tumorellenes immunválasz a melanoma metasztázisok regressziójához vezet.

Köszönetnyilvánítás

Mély és őszinte hálával tartozom témavezetőmnek és barátomnak, **Buzás Krisztinának** a kiváló tudományos útmutatásért, a folyamatos motivációért, feltétel nélküli bizalmáért, türelméért, és rendíthetetlen hitéért. Ez a tézis nem született volna meg a segítségével és támogatása nélkül.

Köszönöm **Horváth Péternek**, a Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport, valamint a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet vezetőjének a munkám során nyújtott szakmai támogatását.

Hálás köszönettel tartozom munkatársaimnak, **Harmati Máriának**, **Pintér Lillának**, **Dobra Gabriellának**, és **Bukva Mátyásnak** a tudományos, technikai, és személyes támogatásért, valamint a remek légkör megteremtéséért. Emellett köszönöm a Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport további tagjainak munkáját és támogatását.

Köszönettel tartozom **Marton Annamáriának**, **Vizler Csabának**, **Jósvay Katalinnak** a tudományos és technikai segítségért.

Továbbá köszönöm valamennyi társszerzőnknek a támogatást, az együttműködést, a kutatómunkámhoz való hozzájárulást.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni **Závodszy Péternek**, **Gál Péternek**, **Kocsis Andreának**, **Balczerné Júliannának**, **Dobó Józsefnek**, **Hajdú Istvánnak**, **Végh Barbarának**, **Barna Lászlónak**, **Beinrohr Lászlónak** a Strukturális Biofizikai Laboratórium munkatársainak, a szerkezeti biokémia világában történt bolyongásaim során nyújtott útmutatásukért, türelmükért és támogatásukért.

Kutatásaink nem valósulhattak volna meg anyagi támogatás nélkül, munkámat a GINOP-2.3.2-15-2016-00015; GINOP-2.2.1-15-2017-00052, az NKFI-6-K-11493, ÚNKP-19-4. pályázatok, a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja, valamint a Szegedi Tudományegyetem Open Access alapja támogatta.

Végül, de ami a legfontosabb, szeretnék köszönetet mondani szüleimnek és testvéremnek a feltétel nélküli gondoskodásért és támogatásért. És nagyon köszönöm családomnak – akik sokat nélkülöztek az elmúlt időkben –, támogatásuk, bátorításuk és türelmük nélkül nem sikerült volna.